

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12Q 1/68

G01N 13/16



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510016720.8

[43] 公开日 2005 年 11 月 16 日

[11] 公开号 CN 1696312A

[22] 申请日 2005.4.18

[21] 申请号 200510016720.8

[71] 申请人 中国科学院长春应用化学研究所

地址 130022 吉林省长春市人民大街 5625 号

[72] 发明人 宋永海 李 壮 刘志国 魏 刚

王 丽 孙兰兰

[74] 专利代理机构 长春科宇专利代理有限责任公司

代理人 马守忠

权利要求书 1 页 说明书 3 页

[54] 发明名称 原子力显微镜研究 DNA 所用样品的制备方法

[57] 摘要

本发明是一种原子力显微镜研究 DNA 所用样品的制备方法。首先将 DNA 与适量的二价金属离子混合溶液,二者基本配比为, $1\text{ng}/\mu\text{lDNA}: 1\text{mM Mg}^{2+}$, 于 $37 \sim 40^\circ\text{C}$ 加热 $30 \sim 60$ 分钟,取其溶液 $20 \mu\text{l}$ 滴在 1.5cm^2 新解离的云母表面, 25°C 吸附 $5 \sim 8$ 分钟。然后于 $4 \sim 25^\circ\text{C}$ 下在超纯水中进行扩散无机盐离子,扩散时间为 $10 \sim 30$ 分钟。样品从水中取出后放在无水乙醇中 $10 \sim 40$ 秒。最后样品在 25°C 、氮气保护下干燥 2 小时。此扩散方法制备的 DNA 样品避免了水冲洗的缺点,保持了 DNA 分子的构象及制备了清洁的样品。制备样品的成功率高达 95% 以上。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1、一种原子力显微镜研究 DNA 所用样品的制备方法，其特征在于：

1) 将 DNA 与醋酸镁混合溶液，于 37~40 °C 加热 30~60 分钟，DNA 与醋酸镁基本配比为：1ng/ μ l DNA：1mM 醋酸镁；

2) 将加热好的 DNA 上述混合溶液滴在新解离的云母表面于 25°C 下吸附 5~8 分钟；

3) 将吸附有 DNA 溶液的云母于 4~25°C 下放在 18.2 M Ω cm 的超纯水中进行扩散；

4) 然后，取出样品放在无水乙醇中 10~40 秒后于 25°C、氮气保护条件下干燥至少 2 小时。

2、根据权利要求 1 所述的原子力显微镜研究 DNA 所用样品的制备方法，其特征在于所述的 DNA 浓度为 10~25 ng/ μ l 时，DNA 与醋酸镁混合溶液滴在云母表面的量与云母面积的基本比为 20 μ l/1.5 cm²，扩散时间为 10~30 分钟制备出 DNA 单分子膜。

3、根据权利要求 1 所述的原子力显微镜研究 DNA 所用样品的制备方法，其特征在于所述的线性 DNA 浓度大于零、小于 2.5 ng/ μ l 时，DNA 与醋酸镁混合溶液滴在云母表面的量与云母面积的基本比为 20 μ l/1.5 cm²，扩散时间为 10~30 分钟制备出伸展的 DNA。

4、根据权利要求 1 所述的原子力显微镜研究 DNA 所用样品的制备方法，其特征在于所述的质粒 DNA PBR 322 浓度大于零、小于 2.5 ng/ μ l 时，DNA 与醋酸镁混合溶液滴在云母表面的量与云母面积的基本比为 20 μ l/1.5 cm²，扩散时间为 10~30 分钟制备出质粒 DNA。

原子力显微镜研究 DNA 所用样品的制备方法

技术领域

本发明属于采用超纯水中扩散法制备样品的方法，具体地说是一种原子力显微镜研究 DNA 所用样品的制备方法。

背景技术

原子力显微镜是继光学显微镜，电子显微镜之后发展起来的第三代新型显微镜之一。它依靠微小的探针来探测被测物的形貌及其电、磁、粘弹力、硬度等性质。由于其超高的分辨率、不需要基底具有导电性、能够在液体和大气环境下操作等优点，原子力显微镜已经被广泛地用于成像 DNA 和研究 DNA 与其它分子的相互作用中。在这些研究中，云母以其原子级平整度、超大的单晶面和容易解离制备新的表面等特点而成为广泛使用的基底。因此基于云母基底制备 DNA 样品成为人们研究的主要目标。以往所使用的二价金属离子法固定 DNA 时，是先将 DNA 滴在云母表面吸附几分钟（1~3 分钟），然后用超纯水冲洗，最后空气干燥（如 *Nucleic Acids Research* 24(14) (1996) 713-720）。这种处理方法由于在水冲洗的过程中无法控制性，使得制备的 DNA 样品成功率很低（破坏了吸附到基底上的 DNA 构像及造成 DNA 的部分群集等）。再者短时间的冲洗并不能有效地去除吸附在 DNA 分子上的盐离子，使得在干燥过程中它们在表面及 DNA 分子上析出形成盐的结晶体严重干扰了 DNA 的成像。此外水冲洗也去除了大量的 DNA 分子，使得吸附到基底表面的 DNA 分子变得很少，造成 DNA 样品的浪费。其它基于表面修饰的方法，如硅烷化、戊二醛化等也同样存在这些问题。

发明内容

为了解决现有技术存在的缺陷，基于无机盐离子与 DNA 相互作用和在两个不同浓度的溶液中扩散的理论，改进了以往制样中水冲洗步骤，将吸附有 DNA 样品的基底放在超纯水中进行扩散制备 DNA 样品。本发明的目的是提供

一种原子力显微镜研究 DNA 所用样品的制备方法。

本发明的步骤如下：

1)、将 DNA 与适量的醋酸镁混合配成溶液，二者基本配比为， $1\text{ng}/\mu\text{l}$ DNA： 1mM 醋酸镁，于 $37\sim 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 加热 $30\sim 60$ 分钟。最佳温度为 $38\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，最佳时间为 30 分钟；

2)、将加热好的 DNA 上述混合溶液，滴在新解离的云母表面。云母表面为室温 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，吸附 $5\sim 8$ 分钟。一般是 $20\text{ }\mu\text{l}$ 滴在 1.5 cm^2 表面上；

3)、将吸附有 DNA 溶液的云母于 $4\sim 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下放在超纯水 ($18.2\text{ M}\Omega\text{ cm}$) 中进行扩散。吸附在 DNA 上的阳离子便向超纯水中扩散，DNA 磷酸骨架上由于阳离子失去，负电性增加而产生排斥作用使得 DNA 分子自发地分散、展开；

4)、然后，取出样品放在无水乙醇中 $10\sim 40$ 秒，最佳为 30 秒。吸附在样品表面的水分子向乙醇中扩散，加速了样品的干燥也增强了 DNA 分子的稳定性。最后于 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、氮气保护条件下干燥至少 2 小时。

这种方法制备的 DNA 样品经原子力显微镜表征发现 DNA 分散性较好 (DNA 分子的两条链几乎完全伸展且很少有交叠) 且均匀 (样品的表面密度均匀)，样品清洁 (几乎没有盐的结晶体存在于基底表面及 DNA 分子上)，样品重复性可高达 95% 以上。制作过程较为简单、实用、DNA 用量少。可用于制备紧密的 DNA 单分子膜 (条件是 DNA 浓度为 $10\sim 25\text{ng}/\mu\text{l}$ ，滴在云母表面的量与云母面积的基本配比为 $20\mu\text{l}/1.5\text{ cm}^2$ ，扩散时间为 $10\sim 30$ 分钟)、完全伸展的线性 DNA (条件是线性 DNA 浓度小于 $2.5\text{ng}/\mu\text{l}$ ，滴在云母表面的量与云母面积的基本配比为 $20\mu\text{l}/1.5\text{ cm}^2$ ，扩散时间为 $10\sim 30$ 分钟)、开环的质粒 DNA (条件是质粒 DNA 浓度小于 $2.5\text{ng}/\mu\text{l}$ ，滴在云母表面的量与云母面积的基本配比为 $20\mu\text{l}/1.5\text{ cm}^2$ ，扩散时间 $10\sim 30$ 分钟) 等。这种方法制备的样品非常适合原子力显微镜成像，特别是研究 DNA 分子与其它分子的相互作用。

本发明改进了以往制样中水冲洗步骤，将吸附有 DNA 的云母放在超纯水 ($18.2\text{ M}\Omega\text{ cm}$) 中自发扩散去除吸附的盐离子，使 DNA 分子自发展开。避免了水冲洗的缺点，制备的 DNA 样品成功率高达 95% 以上。

具体实施方式

实施例 1

12.5 ng/ μ l λ ~DNA 与 12.5 mM Mg^{2+} 混合溶液于 38°C 加热 30 分钟, 取其 20 μ l 滴在 1.5 cm² 新解离的云母表面吸附 7~8 分钟 (25°C), 将该云母于 4°C 下放在超纯水中扩散 30 分钟, 取出后放在无水乙醇中 30 秒, 最后于 25°C, 氮气保护下干燥 2 小时。原子力显微镜表征此方法制备了 DNA 紧密的单分子膜。

实施例 2

2.5 ng/ μ l 质粒 DNA pBR 322 与 2.5 mM 醋酸镁混合溶液于 38°C 加热 30 分钟, 取其 20 μ l 滴在 1.5 cm² 新解离的云母表面吸附 7~8 分钟 (25°C), 将该云母于 4°C 下放在超纯水中扩散 30 分钟, 取出后在无水乙醇中放置 30 秒, 最后于 25°C、氮气保护下干燥 2 小时。原子力显微镜表征此方法制备了展开的质粒 DNA 分子。

实施例 3

2.5 ng/ μ l 线性 DNA pBR 322 / Pst I 与 2.5 mM 醋酸镁混合溶液于 38°C 加热 30 分钟后, 取其 20 μ l 滴在 1.5 cm² 新解离的云母表面吸附 7~8 分钟 (25°C), 将该云母于 4°C 下放在超纯水中扩散 30 分钟, 取出后放在无水乙醇中 30 秒, 最后于 25°C、氮气保护下干燥 2 小时。原子力显微镜表征此方法制备了完全伸展的线型 DNA 分子。